

New protein and its DNA - useful as drug for prevention and treatment of diseases associated  
inactive protein

Patent Assignee: TAKEDA CHEM IND LTD

#### Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
JP 10324698	A	19981208	JP 9876375	A	19980325	199908	B

Priority Applications (Number Kind Date): JP 9776924 A ( 19970328)

#### Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
JP 10324698	A		22	C07K-014/47	

#### Abstract:

JP 10324698 A

New protein having an amino acid sequence same or substantially same as (I) or its salt. Also claimed are: (1) a partial peptide of (I) (or its salt); (2) a DNA (I') comprising a base sequence encoding (I); (3) a recombinant vector containing (I'); (4) a transformant carrying the above recombinant vector; (5) a method for the preparation of (I) (or its salt) comprising culturing the transformant to form and accumulate the above protein and its recovery; (6) a drug containing (I) (or DNA); (7) an antibody against (I); (7) the above partial peptide (or their salts); (8) a method for screening a compound inhibiting fat cell differentiation inducing activity of (I); (9) the above partial peptide (or their salts) or a salt using the above partial peptide (or their salts); and (10) a kit for screening a compound inhibiting fat cell differentiation inducing activity (I).

ADVANTAGE - (I) and (I') are useful in a drug for preventing and treating diseases caused by the deletion of (I).

Dwg.0/3

Derwent World Patents Index

© 2005 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 12283987

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-324698

(43)公開日 平成10年(1998)12月8日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
C 07 K 14/47		C 07 K 14/47
A 61 K 31/70		A 61 K 31/70
35/72	ADP	35/72
35/74	ABX	35/74
35/76	ABU	35/76
		審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平10-76375	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成10年(1998)3月25日	(72)発明者	東條 英明 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田 春日ハイツ902号
(31)優先権主張番号	特願平9-76924	(72)発明者	五十嵐 貢一 京都府京都市左京区下鴨宮崎町66番地の3
(32)優先日	平9(1997)3月28日	(74)代理人	弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

(54)【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

(57)【要約】

【課題】新規な脂肪細胞分化誘導因子の提供。  
【解決手段】脂肪細胞分化誘導作用などの活性を有するタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質もしくはDNA含有してなる医薬、該タンパク質の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる化合物またはその塩、および該タンパク質に対する抗体など。

【効果】本発明のタンパク質またはDNAは、例えば、本発明のタンパク質の欠損に起因する疾病的治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明の抗体は、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】脂肪細胞分化誘導作用を有する請求項 1 記載のタンパク質。

【請求項 3】請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 4】請求項 1 記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項 5】配列番号：2で表わされる塩基配列を有する請求項 4 記載のDNA。

【請求項 6】請求項 4 記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項 7】請求項 6 記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項 8】請求項 7 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質またはその塩の製造方法。

【請求項 9】請求項 1 記載のタンパク質を含有してなる医薬。

【請求項 10】請求項 4 記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項 11】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 12】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 13】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 14】請求項 12 記載のスクリーニング方法または請求項 13 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、脂肪細胞分化誘導作用などを有する新規タンパク質およびそのDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化促進因子として、細胞膜構成成分であるコラーゲン、ラミニン等（ジャーナル・オブ・バイオロジー・ケミストリー

（J. Biol. Chem.）, 263, 16163-16169, 1988）、インスリン様増殖因子（IGF）-1（インターナショナル・ジャーナル・オブ・オペシティー（Int. J. Obesit. y）, 17, 159-167, 1993）、プロスタグランジン類（ジャーナル・オブ・バイオロジー・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267, 11092-11097, 1992）、脂肪酸（ジャーナル・オブ・リピッド・リサーチ（J. Lipid Res.）, 35, 930-937, 1994）、甲状腺ホルモン（モレキュラー・アンド・セルラー・バイオケミストリー（Mol. Cell. Biochem.）, 76, 35-43, 1987）、グルココルチコード（エクスペリメント・セル・リサーチ（Exp. Cell Res.）, 189, 247-252, 1990）等が知られている。さらに、これらの物質の作用メカニズムとしては、脂肪酸、プロスタグランジン類が、脂肪細胞特異的な受容体型転写調節因子であるPPAR $\gamma$ 2のリガンドとして作用することが知られている（ジーンズ・アンド・ディベロップメント（Genes & Development）, 8, 1224-1234, 1994）。

【0003】

【本発明が解決しようとする課題】本発明は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導作用を有する新規タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該タンパク質をコードするDNA、組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質またはDNAを含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導作用を阻害する化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニング方法で得られる化合物等を提供する。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、マウス心臓由来cDNAライブラリーから、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功し、それにコードされるタンパク質が脂肪細胞分化誘導作用などの機能を有することを見いだした。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩、（2）脂肪細胞分化誘導作用を有する第（1）項記載のタンパク質、（3）第（1）項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、（4）第（1）項記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、（5）配列番号：2で表わされる塩基配列を有する請求項 4 記載のDNA、（6）第（4）項記載のDNAを含有する組換えベクター、（7）第（6）項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、（8）第（7）項記載の形質転換体を培養し、第（1）項記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴と

する第（1）項記載のタンパク質またはその塩の製造方法、

【0006】（9）第（1）項記載のタンパク質を含有してなる医薬、（10）第（4）項記載のDNAを含有してなる医薬、（11）第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、（12）第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、（13）第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、および（14）第（12）項記載のスクリーニング方法または第（13）項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩を提供する。

【0007】さらに、本発明は、（15）（i）第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有する前駆体脂肪細胞を脂肪細胞に分化させた場合と、（ii）第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有する前駆体脂肪細胞を試験化合物の存在下で脂肪細胞に分化させた場合における、脂肪細胞分化誘導作用を測定し、比較することを特徴とする第（12）項記載のスクリーニング方法、（16）第（12）項または第（15）項記載のスクリーニング方法または第（13）項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、（17）肥満、糖尿病、動脈硬化または高血圧症の治療・予防剤である第（15）項記載の医薬、（18）第（1）項記載の抗体と、被検液および標識化された第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の第（1）項記載のタンパク質、第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および（19）被検液と担体上に不溶化した第（11）項記載の抗体および標識化された第（11）項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の第（1）項記載のタンパク質、

第（3）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髓細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはこれらの細胞が存在するあらゆる組織（例、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など）または血球系の細胞もしくはその培養細胞株などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0009】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同意を有するアミノ酸配列などが挙げられ、より具体的には、タンパク質の構成アミノ酸配列として配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同意を有するアミノ酸配列などが好ましい。本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、脂肪細胞分化誘導作用などが挙げられる。実質的に同質とは、これらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、脂肪細胞分化誘導作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の

分子量などの量的要素は異なっていてもよい。脂肪細胞分化誘導作用の活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0010】また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-ブロピル、イソブロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロヘンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

【0011】本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えばOH、COOH、NH<sub>2</sub>、SHなどが適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタ

ンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス心臓由来のタンパク質などが用いられる〔図1〕。

【0012】本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであつて、脂肪細胞分化誘導作用を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有し、脂肪細胞分化誘導作用するペプチドなどが用いられる。また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

【0013】本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合

わせることにより精製単離することができる。

【0014】本発明のタンパク質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0015】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0016】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0017】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd黑あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミ

ン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0018】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質（部分ペプチド）とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質（部分ペプチド）とを製造し、この両タンパク質（部分ペプチド）を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質（部分ペプチド）を得ることができる。この粗タンパク質（部分ペプチド）は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質（部分ペプチド）のアミド体を得ることができる。タンパク質またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質（部分ペプチド）のアミド体と同様にして、所望のタンパク質（部分ペプチド）のエステル体を得ることができる。

【0019】本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適當なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによつても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①

～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および 柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適當な塩に変換することができるとし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0020】本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNA画分またはmRNA画分を調製したもの用いて、直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって增幅することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性、例えば、脂肪細胞分化誘導作用などの活性を有するタンパク質をコードするDNAであればいずれのものでもよい。

【0021】配列番号：2で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約85%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法

などに従って行なうことができる。また、市販のライブライマーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる【図1】。

【0022】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAの何れでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列、または配列番号：2で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0023】本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutant<sup>TM</sup>-G（宝酒造（株））、Mutant<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンクーを付加したりして使用することができる。該DNAは

その5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0024】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0025】発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子【メソトレキセート（MTX）耐性】、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO(dhfr-)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択することができる。また、必要に応じて、宿主に合つ

たシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF  $\alpha$ ・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0026】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 12 · DH 1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60卷, 160 (1968)], JM 103 [スクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9卷, 309 (1981)], JA 221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120卷, 517 (1978)], HB 101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41卷, 459 (1969)], C 600 [ジェネティックス (Genetics), 39卷, 440 (1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M 1114 [ジーン, 24卷, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95卷, 87 (1984)]などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 22, AH 22 R<sup>-</sup>, NA 87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンペ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC 1913, NCYC 2036、サッカロマイセス ピキア パストリス (*Saccharomyces picaria pastoris*) などが用いられる。

【0027】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合には、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG 1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five™細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または*Estigmene acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合には、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; BmN 細胞) などが用いられる。該 Sf 細胞としては、例えば、Sf 9 細胞 (ATCC CRL1711)、Sf 21 細胞 (以上, Vaughn, J. L. ら, イン・ヴィボ (in vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。昆虫と

しては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315卷, 592 (1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞、マウス At T-20, マウスミエローマ細胞、ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69卷, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17卷, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0028】バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168卷, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194卷, 182-187 (1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75卷, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52卷, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカ、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0029】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地

[ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働くために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や搅拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や搅拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77卷, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 81卷, 5330 (1984) ] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。

【0030】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122卷, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8卷, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199卷, 519 (1967)], 199培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73卷, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0031】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことが

できる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集め。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0032】かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0033】本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### [モノクローナル抗体の作製]

##### (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗

体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0034】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を探取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルストайнの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0035】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～2

0%の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1～10%の牛胎児血清を含む GIT 培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### 【0036】(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0037】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原(タンパク質抗原)とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に關し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジン基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の

分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0038】本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）に実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列の全塩基配列または部分塩基配列と約85%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの全塩基配列うち、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）に相補的な塩基配列と約85%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。また、これらアンチセンスDNAと同様の作用を有する核酸配列（RNAまたはDNAの修飾体）も本願でいうアンチセンスDNAに含まれる。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0039】本発明のタンパク質は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化の過程において発現され、特に、脂肪細胞分化誘導作用などの活性を有する。以下に、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0040】（1）本発明のタンパク質が関与する各種疾病的治療・予防剤

本発明のタンパク質等またはDNAに異常があつたり、欠損している場合あるいは発現量が減少している場合、生体内において正常な機能を発揮できないために、例えば、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が正常に行なわれない。したがって、本発明のタンパク質等およびDNAは、例えば、本発明のタンパク質等またはDNAの欠損・損傷・発現減少などに起因する種々の疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が十分に、あるいは正常に行なわれない患者（例えば、やせ過ぎの患者）がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質等を発現させた後に、

該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のタンパク質等を該患者に注入することなどによって、該患者における本発明のタンパク質等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスゾシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子錠やハイドログルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

【0041】本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。本発明のタンパク質等またはDNAは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等またはDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0042】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレンギリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油な

どが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。該タンパク質等またはDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人の糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象組織、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人の糖尿病患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### 【0043】(2) 各種疾患に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質等は、例えば、脂肪細胞分化誘導作用などの活性を有するため、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、肥満、糖尿病、動脈硬化、高血圧症などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、(1) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の活性（例、脂肪細胞分化誘導作用など）を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。具体的には、例えば、(2a)

(i) 本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞を脂肪細胞に分化させた場合と、(ii) 本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞を試験化合物の存在下で脂肪細胞に分化させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のタンパク質等の阻害剤のスクリーニング方法、または(2b)

(i) 本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞を脂肪細胞に分化させた場合と、(ii) 本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し

得る細胞を試験化合物の存在下で脂肪細胞に分化させた場合との比較を行なうことを特徴とする、本発明のタンパク質等の発現を阻害する化合物（以下、発現阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。具体的には、上記スクリーニング方法(2a)または(2b)において、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明のタンパク質等の活性を測定して、比較することを特徴とするものである。

【0044】本発明のタンパク質等およびDNAとしては、前記したものと同様のものが用いられる。本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞としては、前駆脂肪細胞の他、本発明のDNAを導入せしめた株細胞などが用いられる。前駆脂肪細胞としては、例えば、3T3-L1 (セル(Cell) 3, 127-133(1974))、3T3-F442A (セル(Cell) 7, 105-113(1976))、Ob1771 (プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 6054-6058(1988))、ST13 (インヴィトロ (In Vitro), 16, 658-693(1980))などの公知の細胞が用いられ、なかでも、3T3-L1などが好適である。本発明のDNAを導入せしめた株細胞は自体公知の方法を用いて製造することができる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。前駆脂肪細胞から脂肪細胞へ分化させる手法としては、自体公知の方法、例えば、ジャーナル・オブ・バイオロジーカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 266, 4722-4731(1992)などに記載の方法などが挙げられる。

【0045】本発明のタンパク質等の活性としては、例えば、脂肪細胞分化誘導作用などが挙げられる。また、本発明のタンパク質等をコードするmRNAの発現量、本発明のタンパク質等の発現量などを指標とすることができる。本発明のタンパク質等の脂肪細胞誘導作用は、自体公知の方法を用いて測定することができるが、例えば、前駆体脂肪細胞から脂肪細胞への分化の過程において产生される中性脂肪の量を指標として測定することができる。具体的には、セル(Cell), 5, 19-27(1975)などに記載の中性脂肪染色法に従って測定することができる。本発明のタンパク質等をコードするmRNAの発現量は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーションなどによって測定することができる。本発明のタンパク質等の発現量は、後述する本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法に従って測定することができる。試験化合物を添加することにより本発明のタンパク質等の活性（例、脂肪細胞分化誘導作用など）、本発明のタンパク質等をコードするmRNAの発現量または本発明のタンパク質等の発現量が約10%以上、好ましくは約20%

%以上、より好ましくは約30%以上、最も好ましくは約50%以上阻害された場合、該試験化合物は本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物として選択することができる。

【0046】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものであってもよく、あるいは、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞を含有するものであってもよい。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

①本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞

3T3-L1前駆脂肪細胞 ( $10^4$ セル/ウェル) を、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地 (pH 7.2) を用いて96穴プレートで5%炭酸ガス下、37°Cで培養したもの。

②分化誘導用培地

10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地 (pH 7.2) にインスリン 10 mg/ml、デキサメタゾン  $10 \mu M$ 、イソブチルメチルキサンチン 0.5 mMを添加したもの。

③検出

イソプロパノール溶液 (Oil Red O) による中性脂肪の染色

【0047】〔測定法〕本発明のタンパク質等を脂肪細胞への分化過程で生産し得る細胞(例、3T3-L1)をリン酸緩衝液で2回洗浄した後、10%ホルマリン/リン酸緩衝液に室温で1時間浸すことにより固定する。固定された細胞を0.5% (W/V) のOilRed Oで染色する。染色後、この細胞を60%イソプロパノールで2回洗浄することにより、中性脂肪のみが染色された細胞標本を得ることができる。さらに、Oil Red Oを100%イソプロパノールで中性脂肪から溶出し、510 nmの吸光度を測定することにより中性脂肪の含有量を定量する。試験化合物を添加することにより、中性脂肪の染色度が約10%以上、好ましくは約20%以上、より好ましくは約30%以上、最も好ましくは約50%以上阻害された場合、該試験化合物を本発明のタンパク質等の脂肪細胞分化誘導作用を阻害する化合物として選択する。

【0048】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の活性(例、脂肪細胞分化誘導作用など)を阻害する化合物である。該化合物またはその塩は、本発明のタンパク質等の活性を直接阻害するものであってもよいし、本発明のタンパク質等の発現を阻害することによって間接的に本発明のタンパク質等の活性を阻害するものであってもよい。該化合物の塩としては、

例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-二ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシリアルアミン、ジシクロヘキシリアルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどの塩などがあげられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩などがあげられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クレン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などの塩などがあげられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギリジン、リジン、オルチニンなどの塩などがあげられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などの塩などがあげられる。本発明のタンパク質等の活性(例、脂肪細胞誘導作用など)を阻害する化合物は、例えば、肥満、糖尿病、動脈硬化、高血圧症などの各種疾患に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のタンパク質等またはDNAを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。得られる製剤は安全で低毒性があるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えは、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人の糖尿病患者(体重60 kgとして)においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによって異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人の糖尿病患者(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0049】(3) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0050】また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコンダーゼ、アルカリフェオヌファーゼ、ペーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノル誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0051】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵

素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0052】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0053】これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「統ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参考することができる。以上のようにして、本発明のタンパク質抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。さらには、本発明のタンパク質抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、例えば、本発明のタンパク質等が関与する疾病的診断を行なうことができる。具体的には、本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質等の濃度の増加が見られた場合は、例えば、肥満、糖尿病、動脈硬化、高血圧症などの疾病であると診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0054】(4) 遺伝子診断剤  
本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子

診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロセッシング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、肥満、糖尿病、動脈硬化、高血圧症である可能性が高いと診断することができる。

#### 【0055】(5) アンチセンスDNA

前記のとおり、本発明のタンパク質等は脂肪細胞分化誘導作用を有する。したがって、本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質等またはDNAの機能を抑制することができるので、肥満、糖尿病、動脈硬化、高血圧症などの治療・予防剤などの医薬として使用することができる。上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾患の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

#### 【0056】(6) 本発明のタンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵ヘマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

【0057】受精卵細胞段階におけるDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するよう確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継

いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有する。本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明のDNAが転移された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等の活性阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用の動物などとして有用である。本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質等が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。

【0058】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン

Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl <sub>2</sub> Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C1-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブロキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェノール
Trt	: トリチル

RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャー・リボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

#### 【0059】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基

【0060】また、本明細書中で頻用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

B u m	: t-ブロキシメチル
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド
D C C	: N, N'-ジシクロヘキシカルボジイミド

【0061】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕本発明のマウス心臓由来タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のマウス心臓由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕本発明のタンパク質をコードするDNAのクローニングに使用したプローブad24-155の塩基配列を示す。後述の実施例1で得られた形質転換体エッセリヒアコリ(Escherichia coli)JM109/pTB1963は、平成9年3月27日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5888として寄託されている。

#### 【0062】

【実施例】以下に、参考例および実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

#### 【0063】

【実施例1】本発明のマウス心臓由来のタンパク質をコードするcDNAのクローニング

(1) 3T3-L1前駆脂肪細胞が脂肪細胞へ分化する過程で発現誘導されるmRNAのサブトラクションによる濃縮

3T3-L1細胞は10%のウシ胎児血清(fetal bovine serum; FBS)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium; DME M)で培養した。上記培地で培養し、コンフルエンントに達した3T3-L1細胞を前駆脂肪細胞のサンプルとした。一方、コンフルエンントに達した3T3-L1細胞を、上記培地にインスリン(10mg/ml)、デキサメタゾン(10μM)およびイソブチルメチルキサンチン(0.5mM)を添加した培地で48時間培養後、10%FBS含有DMEMに戻し、さらに24時間培養した細胞を、脂肪細胞へ分化する過程の細胞のサンプルとした。両サンプルとも、酸性フェノール(ISOCHEM; ニッポンジーン社製)を用いて、全RNAを抽出し、さらにオリゴ-dTセルロースカラム(ファルマシア社製)を通して、poly(A)<sup>+</sup>RNAを精製した。これらのpoly(A)<sup>+</sup>RNAそれぞれ2μgを出発材料にしてPCR-s

elect cDNAサブトラクションキット(Clontech社製)を用いたサブトラクションにより、脂肪細胞分化過程に特異的に発現しているcDNA断片(cDNAの一部をPCRで増幅した断片)を収集した。得られたPCR断片の両端に付加しているサブトラクションのためのアダプターの配列を制限酵素RsaIで消化することにより除去し、平滑末端のDNA断片にした後、この断片をpCR-Script(Stratagene社製)にサブクローニングした。サブクローニングされたcDNA断片のDNA塩基配列を解読し、明らかとなった塩基配列をもとに公のデータベースであるGenemblleデータベースを用いてblastNによるホモロジー検索を行なった。そこ結果、得られたクローンAD1963は新規なDNA塩基配列を有していた。

【0064】(2) 3T3-L1前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する過程におけるAD1963の発現誘導

3T3-L1前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する過程におけるAD1963の発現誘導をノーザンハイブリダイゼーションで検討した。3T3-L1細胞の分化誘導前および分化誘導開始後3日、4日、6日の細胞より、上記(1)と同様の手法で、poly(A)<sup>+</sup>RNAを抽出し、それぞれ1μgをホルマリン・アガロースゲル電気泳動で分画し、これをナイロン膜に転写した。これに対し、サブトラクションで得られたcDNA断片のうちの1つであるad24-155(配列番号：3；AD1963 cDNA断片の一部であり、配列番号：2で表わされる塩基配列の第452番目～1274番目の塩基配列)を<sup>32</sup>Pで標識し、ハイブリダイゼーションを行なった。このad24-155 cDNAは、脂肪細胞の分化に伴い100倍以上も転写が増大していた【図1】。

【0065】(3) AD1963 cDNA断片の完全長cDNAの単離

AD1963 cDNAの塩基配列の全コード領域を含む完全長cDNAは、サブトラクションで得られたcDNA断片のうちの1つであるad24-155(配列番号：3)をプローブとして用い、マウス心臓cDNAライブラリー(Clontech社製；λgt10 phage vector)からブラークハイブリダイゼーションでスクリーニングすることによって得られた。得られた陽性ファージの1つからcDNAを抽出し、その挿入断片をpBluescript II KS(+) (ストラタジーン社製)にサブクローニングして、その塩基配列を決定した。AD1963の全长cDNAは1982bpで、543個のアミノ酸から

なるポリペプチドをコードしていた〔図2〕。このAD 1963全長cDNAをプラスミドpBluescript II KS (+) (ストラタジーン社製)のNotI部位にサブクローニングし、プラスミドpTB1963を得た〔図3〕。このプラスミドpTB1963を大腸菌(Escherichia coli) JM109に導入して、形質転換体：大腸菌(Escherichia coli) JM109/pTB1963を得た。

#### 【0066】

【発明の効果】本発明のタンパク質等およびDNAは、本発明のタンパク質等の欠損に起因する疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。また、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等の脂肪細胞分化誘導作用等の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量などに使用することができる。

【0067】  
【配列表】  
【配列番号：1】  
配列の長さ：543  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

#### 配列

Met	Phe	Pro	Arg	Glu	Thr	Lys	Trp	Asn	Ile	Ser	Phe	Ala	Gly	Cys	Gly
1															15
Phe	Leu	Gly	Val	Tyr	His	Ile	Gly	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Arg	Glu	His
															30
Ala	Pro	Phe	Leu	Val	Ala	Asn	Ala	Thr	His	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ala
															45
Gly	Ala	Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Thr	Gly	Ala	Cys	Leu	Gly	Glu
															60
Ala	Gly	Ala	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Ser	Lys	Glu	Ala	Arg	Lys	Arg	Phe
					65			70			75				80
Leu	Gly	Pro	Leu	His	Pro	Ser	Phe	Asn	Leu	Val	Lys	Thr	Ile	Arg	Gly
															95
Cys	Leu	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Ala	Asp	Cys	His	Glu	Arg	Ala	Asn	Gly.
					100				105						110
Arg	Leu	Gly	Ile	Ser	Leu	Thr	Arg	Val	Ser	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Ile
					115				120						125
Ile	Ser	His	Phe	Ser	Ser	Lys	Asp	Glu	Leu	Ile	Gln	Ala	Asn	Val	Cys
					130				135						140
Ser	Thr	Phe	Ile	Pro	Val	Tyr	Cys	Gly	Leu	Ile	Pro	Pro	Thr	Leu	Gln
					145				150			155			160
Gly	Val	Arg	Tyr	Val	Asp	Gly	Gly	Ile	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu	Tyr
						165			170						175
Glu	Leu	Lys	Asn	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Ser	Asp
					180				185						190
Ile	Cys	Pro	Gln	Asp	Ser	Ser	Thr	Asn	Ile	His	Glu	Leu	Arg	Val	Thr
					195				200						205
Asn	Thr	Ser	Ile	Gln	Phe	Asn	Leu	Arg	Asn	Leu	Tyr	Arg	Leu	Ser	Lys
					210				215			220			
Ala	Leu	Phe	Pro	Pro	Glu	Pro	Met	Val	Leu	Arg	Glu	Met	Cys	Lys	Gln
					225				230			235			240
Gly	Tyr	Arg	Asp	Gly	Leu	Arg	Phe	Leu	Arg	Arg	Asn	Gly	Leu	Leu	Asn
						245			250			255			
Gln	Pro	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Pro	Val	Val	Pro	Gln	Glu	Glu
					260				265			270			
Asp	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Val	Val	Glu	Glu	Arg	Ala	Gly	Glu	Glu	Asp
						275			280			285			
Gln	Leu	Gln	Pro	Tyr	Arg	Lys	Asp	Arg	Ile	Leu	Glu	His	Leu	Pro	Ala

290	295	300
Arg Leu Asn Glu Ala Leu Leu Glu Ala Cys Val Glu Pro Lys Asp Leu		
305	310	315
Met Thr Thr Leu Ser Asn Met Leu Pro Val Arg Leu Ala Thr Ala Met		
325	330	335
Met Val Pro Tyr Thr Leu Pro Leu Glu Ser Ala Val Ser Phe Thr Ile		
340	345	350
Arg Leu Leu Glu Trp Leu Pro Asp Val Pro Glu Asp Ile Arg Trp Met		
355	360	365
Lys Glu Gln Thr Gly Ser Ile Cys Gln Tyr Leu Val Met Arg Ala Lys		
370	375	380
Arg Lys Leu Gly Asp His Leu Pro Ser Arg Leu Ser Glu Gln Val Glu		
385	390	395
Leu Arg Arg Ala Gln Ser Leu Pro Ser Val Pro Leu Ser Cys Ala Thr		
405	410	415
Tyr Ser Glu Ala Leu Pro Asn Trp Val Arg Asn Asn Leu Ser Leu Gly		
420	425	430
Asp Ala Leu Ala Lys Trp Glu Glu Cys Gln Arg Gln Leu Leu Leu Gly		
435	440	445
Leu Phe Cys Thr Asn Val Ala Phe Pro Pro Asp Ala Leu Arg Met Arg		
450	455	460
Ala Pro Ala Ser Pro Thr Ala Gly Arg Ser Cys His Pro Thr Gly Ser		
465	470	475
Thr Trp Pro Pro Ala Leu Leu Arg Ile Thr Ile Pro Thr Ser Pro Gly		
485	490	495
Tyr Gln Pro Ser Ser Lys Leu Ser Cys Pro Thr Lys Arg Ser Pro Gly		
500	505	510
Val Glu Gln Asp Pro Val Cys Pro Gly Ser Pro Pro Tyr Met Leu Trp		
515	520	525
Asn Glu Asp Ile Gly Pro Cys Thr Ala Ala Ser Gly Leu Ser Met		
530	535	540

【0068】

鎖の数：二本鎖

【配列番号：2】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：1629

配列の種類：cDNA

配列の型：核酸

## 配列

ATGTTCCCGA	GGGAGACCAA	GTGGAACATC	TCATTCGCTG	GCTGCGGCTT	CCTCGGGTC	60
TACCAATTG	GGCTGGCCTC	CTGCCTCCGT	GAGCACGCC	CCTTCCTGGT	GGCCAACGCC	120
ACTCACATCT	ACGGAGCCCTC	GGCAGGGCGC	CTCACCGCCA	CAGCGCTGGT	CACTGGGCC	180
TGCCTGGGTG	AAGCAGGTGC	CAACATTATT	GAGGTGTCCA	AGGAGGCCCG	GAAGCGGTT	240
CTGGGTCTC	TGCATCCCTC	CTTCAACCTG	GTGAAGACCA	TCCGTGGCTG	TCTACTAAAG	300
ACCCCTGCCCTG	CTGATTGCCA	TGAGCGGCC	AATGGACGCC	TGGGCATCTC	CCTGACTCGT	360
GTTCAGACG	GAGAGAACGT	CATCATATCC	CACTTTAGCT	CCAAGGATGA	GCTCATCCAG	420
GCCAATGTCT	GCAGCACATT	TATCCGGTG	TACTGTGGCC	TCATTCTCC	TACCCTCCAA	480
GGGGTGCGCT	ATGTGGATGG	CGGCATTTCA	GACAACCTGC	CACTTTATGA	GCTGAAGAAT	540
ACCATCACAG	TGTCCCCATT	CTCAGGCCAG	AGTGACATCT	GCCCTCAGGA	CAGCTCCACC	600
AACATCCACG	AGCTTCGCGT	CACCAACACC	AGCATCCAGT	TCAACCTTCG	CAATCTCTAC	660
CGCCTCTCGA	AGGCTCTCTT	CCCGCCAGAG	CCCATGGTCC	TCCGAGAGAT	GTGCAAACAG	720
GGCTACAGAG	ATGGACTTCG	ATTCCCTTAGG	AGGAATGGCC	TACTGAACCA	ACCCAACCC	780
TTGCTGGCAC	TGCCCCCAGT	TGTCCCCCAG	GAAGAGGATG	CAGAGGAAGC	TGCTGTGGTG	840

GAGGAGAGGG CTGGAGAGGA GGATCAATTG CAGCCTATA GAAAAGATCG AATTCTAGAG 900  
 CACCTGCCTG CCAGACTCAA TGAGGCCCTG CTGGAGGCCT GTGTGGAACC AAAGGACCTG 960  
 ATGACCACCC TTTCAACAT GCTACCACTG CGCCTGGCAA CGGCCATGAT GGTGCCCTAT 1020  
 ACTCTGCCGC TGGAGAGTGC AGTGTCCCTC ACCATCCGCT TGTGGAGTG GCTGCCCTGAT 1080  
 GTCCCTGAAG ATATCCGGTG GATGAAAGAG CAGACGGGTG GCATCTGCCA GTATCTGGTG 1140  
 ATGAGGGCCA AGAGGAAATT GGGTGACCAT CTGCCTTCCA GACTGTCTGA GCAGGTGCAA 1200  
 CTGCGACGTG CCCAGTCTCT GCCCTCTGTG CCACTGTCTT GCGCCACCTA CAGTGAGGCC 1260  
 CTACCCAACG GGGTACGAAA CAACCTCTCA CTGGGGGACG CGCTGGCCAA GTGGGAAGAA 1320  
 TGCCAGCGTC AGCTACTGCT GGGTCTCTTC TGCACCAATG TGGCCTTCCC GCCGGATGCC 1380  
 TTGCGCATGC GCGCACCTGC CAGCCCCACT GCCGGCAGAT CCTGCCACCC CACAGGATCC 1440  
 ACCTGGCCTC CCGCCTTGCT GAGAACATC ATTCCCACAT CGCCCGGCTA CCAGCCAAGC 1500  
 TCCAAGTTGT CCTGCCAC TAAGAGGAGC CCCGGGTGG AACAAAGATCC TGTCTGCC 1560  
 GGCTCTCCCC CTTACATGCT GTGGAATGAG GACATAGGAC CCTGCACAGC TCCAAGTGGG 1620  
 CTTTCGATG 1629

【0069】

【配列番号：3】

配列の長さ：823

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c DNA

配列

ACTGTGGCCT CATTCCCTCCT ACCCTCCAAG GGG  
 TCGCTA TGTGGATGGC GGCATTTCAAG 60  
 ACAACTTGCC ACTTTATGAG CTGAAGAATA CCA  
 TCACAGT GTCCCCATTC TCAGGGCGAGA 120  
 GTGACATCTG CCCTCAGGAC AGCTCCACCA ACA  
 TCCACGA GCTTCGCGTC ACCAACACCA 180  
 GCATCCAGTT CAACCTTCGC AATCTCTACC GCC  
 TCTCGAA GGCTCTCTTC CCGCCAGAGC 240  
 CCATGGTCCT CCGAGAGATG TGCAAACAGG GCT  
 ACAGAGA TGGACTTCGA TTCCTTAGGA 300  
 GGAATGGCCT ACTGAACCAA CCCAACCCCTT TGC  
 TGGCACT GCCCCCCAGTT GTCCCCCAGG 360  
 AAGAGGATGC AGAGGAAGCT GCTGTGGTGG AGG  
 AGAGGGC TGGAGAGGAG GATCAATTGC 420  
 AGCCTTATAG AAAAGATCGA ATTCTAGAGC ACC  
 TGCCTGCAACT CAGACTCAAT GAGGCCCTGC 480  
 TGGAGGCCTG TGTGGAACCA AAGGACCTGA TGA  
 CCACCCCT TTCCAACATG CTACCAGTGC 540  
 GCCTGGCAAC GGCCATGATG GTGCCCTATA CTC  
 TGCCGCT GGAGAGTGCA GTGTCCTTCA 600  
 CCATCCGCTT GTTGGAGTGG CTGCCTGATG TCC  
 CTGAAGA TATCCGGTGG ATGAAAGAGC 660  
 AGACGGGTAG CATCTGCCAG TATCTGGTGA TGA  
 GGGCCAA GAGGAAATTG GGTGACCATC 720  
 TGCCTTCCAG ACTGTCTGAG CAGGTGGAAC TGC  
 GACGTGCA CCAGTCTCTG CCCTCTGTGC 780  
 CACTGTCTTG CGCCACCTAC AGTGAGGCC TAC  
 CCAACTG GGT 823

【0070】

【図面の簡単な説明】

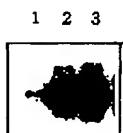
【図1】本発明のマウス心臓由来タンパク質をコードす

るmRNAの3T3-L1前駆脂肪細胞における発現量をノザンハイブリダイゼーションで調べた結果を示す電気泳動写真である。レーン1は3T3-L1前駆脂肪細

胞、レーン2は3T3-L1前駆脂肪細胞を脂肪細胞分化誘導処理後24時間経過した細胞、レーン3は3T3-L1前駆脂肪細胞を脂肪細胞分化誘導処理後96時間経過した細胞それぞれにおけるmRNAの発現量を示す。プローブはAD1963cDNAの一部であるa d 24-155(配列番号:3)を用いた。

【図2】本発明のマウス心臓由来タンパク質をコードす

【図1】



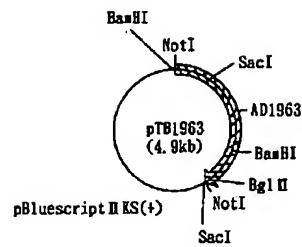
ATG TTC CGG AGG GAC ACC AAC TGC AAC ATC TCA TTC OCT GGC TGC CGC CTC CGG GTC TAC CAC ATT GCG CCT GTC ACT GCG ACC CCC TCC TGT  
 Pro Phe Arg Glu Thr Lys Trp Asn Ile Ser Phe Ala Gly Cys Gly Phe Leu Val Tyr His Ile Gly Val Ala Ser Cys Leu Arg  
 10 20 30 40 50 60 70 80 90  
 GAG CAC CCC TTC CTG GTG CCG AAC CCC ACT CAC ATC TAC QCA GCG TCG QCA CGG CGC CTC ACC GGC ACA GCG CTC GTC ACT GGG GCG  
 Glu His Ala Pro Phe Leu Val Ala Asn Ala Thr His Ile Tyr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Leu Thr Ala Asn Leu Val Thr Gly Ala  
 100 110 120 130 140 150 160 170 180  
 TGC CTG CCT GAA GCA GGT CCC AAC ATT ATT CAG GTG TCC AAG GAG CGG CGG AAC CGG TTC CTG CCT CGT CAT CCT TCC TTC AAC CTG  
 Cys Leu Gly Ctu Ala Gly Ala Asn Ile Ile Ctu Val Ser Lys Gly Ala Arg Lys Arg Leu Gly Pro Leu His Pro Ser Phe Asn Thr  
 190 200 210 220 230 240 250 260 270  
 GTC AAC ACC ATC CGT GGC TGT CTA CTA AMG ACC CGC CCT GCT GAT TGC CAT GAG CGC CGC AAC CCT GGA CGC CGC ATC TCC CTG ACT CCT  
 Val Lys Thr Ile Arg Gly Cys Leu Lys Lys Thr Pro Ala Arg Cys His Glu Arg Ala Asn Gly Arg Leu Gly Ile Ser Lys Leu Thr Arg  
 280 290 300 310 320 330 340 350 360  
 GTT TCA GAC GCA GAG AAC GTC ATC ATA TCC CAC TTT ACC TCC AAG GAT GAG GTC ATC CGC CGC AAC CCT GGA CGC CGC ATC TCC ACC ACA TTT ATC CGG CTG  
 Val Ser Asp Gly Glu Asn Val Ile Ile Ser His Ser Lys Asp Gly His Glu Arg Ala Asn Gly Arg Leu Gly Ile Ser Lys Leu Thr Arg  
 370 380 390 400 410 420 430 440 450  
 TAC TGT GGC CTC ATT CCT CCT ACC CTC CCA GGG GTG CGC TAT GTG GAT GGC CGC ATT TCA GAC AAC CCT GCA CCT TAT GAG CTC ACT AAC ATT  
 Tyr Cys Gly Leu Ile Pro Pro Thr Leu Glu Gly Val Alc Tyr Val Asp Gly Ile Ser Asp Asn Val Leu Pro Leu Tyr Glu Ileu Iys Asn  
 460 470 480 490 500 510 520 530 540  
 ACC ATC ACA GTG TCC CCA TTC TCA GGC GAG AGT GAC ATC TCC CCT CAG GAC AGC TCC ACC AAC ATC CAC GAG CCT CCT GTC ACC AAC ACC ACC  
 Thr Ile Ile Val Ser Pro Phe Ser Gly Glu Ser Asp Ile Cys Pro Gln Asp Ser Ser Thr Asn Ile His Glu Leu Arg Val Thr Asn  
 550 560 570 580 590 600 610 620 630  
 ACC ATC CAC TTC ANC CTT CGC ATT CTC TAC CGC CTC TCC TAT GTG GAT GGC CGC ATT TCA GAC AAC CCT GCA CCT TAT GAG CTC ACT AAC ATT  
 Ser Ile Ile Phn Asn Leu Arg Asn Leu Tyr Asp Arg Lys Asl Asn Gln Pro Gln Pro Met Val Leu Arg Glu Met Cys Lys Ile  
 640 650 660 670 680 690 700 710 720  
 ACC ATC CAC TTC ANC CTT CGC ATT CTC TAC CGC CTC TCC TAT GTG GAT GGC CGC ATT TCA GAC AAC CCT GCA CCT TAT GAG CTC ACT AAC AAC CAG  
 Ser Ile Ile Phn Asn Leu Arg Asn Leu Tyr Asp Arg Lys Asl Asn Gln Pro Gln Pro Met Val Leu Arg Glu Met Cys Lys Ile  
 730 740 750 760 770 780 790 800 810  
 GGC TAC AGA CAT GGA CCTT CGA TTC CTT AAG AAG ATT GGC CTA CTG AAC CAA CCC AAC CCT TTG CTU GCA CTG CGC CCA GTT GTC CCC CAG  
 Gly Tyr Asp Arg Gly Leu Arg Arg Asn Glu Leu Asn Gln Pro Asn Pro Leu Leu Ala Leu Pro Pro Val Pro Val Pro Val Pro Glu  
 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
 GAA GAG GAT CGA CAG GAA CCT OCT GTG GTG GAG AGC CCT GGA GAG CGG CGA GAT CMA TTG CAG CCT TAT GAG AAA GAT CGA ATT CTA CGG  
 Glu Glu Asp Ala Glu Glu Ala Asl Val Val Glu Glu Arg Ala Gly Glu Glu Asp Gln Leu Glu Pro Tyr Arg Lys Asp Arg Ile Leu Glu  
 910 920 930 940 950 960 970 980 990  
 CGC CTG CCT CGC AGA CTC ATT GAG ACC CGC CTG CTG GAG GCC TGT GTG GAA CCT AAC GAG CGT ATG ACC ACC CTT TCC ACC ATG CTA CCA GIG  
 His Leu Pro Ala Arg Leu Asn Glu Ala Leu Glu Ala Cys Val Glu Pro Lys Asp Leu Met Thr Ile Leu Ser Asn Met Leu Pro Val  
 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 CGC CTG CGC AGC ACC ATG ATG CGC CCT TAT ACT CTC CGG CGC ACT GCA CCT TCC TTC ACC ATC CGC TTO TTV GAG TCG TGT CCT CCT GAT  
 Arg Leu Ala Thz His Met Val Pro Tyr The Leu Pro Leu Glu Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Ile Arg Leu Leu Glu Itp Leu Pro Asp  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
 GTC CCT GAA GAT ATC CGG TGG ATG AAA GAG CGG CGG ACC GGT ACC ATC TCC TAT CGG TAT CTG CTG ATG AGG GCG AGG AAA TTT GGT GAC CAT  
 Val Pro Glu Asp Ile Arg Tyr Met Lys Glu Glu Thr Glu Ser Glu Ile Cys Dm Tyr Leu Val Met Arg Ala Iys Arg Lys Leu Gly Asp His  
 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 CTG CCT TCC AGA CTG TCT GAG CGG GTG GAA CTG CGG CGT GGC CGG TGT CTG CGC CCT TCC CCA CTG CCT TCT TCC CCT ACC TCC ACT GAG CGC  
 Pro Pro Ser Arg Leu Ser Glu Val Glu Leu Arg Ala Glu Asn Leu Pro Ser Val Pro Leu Ser Cys Ala Thr Tyr Ser Glu Ala  
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350  
 CTA CGG AAC TGG GTA CGA AAC AAC CTC TCA CTG CGG GAC CGG CTG CCT CGC AMG TGG GAA GAA TGC CAG CGT CGT CAG CTA CTG CCT GGT CTC TCC  
 Leu Pro Asn Trp Val Arg Asn Asn Leu Ser Glu Ile Asp Ala Leu Ala Lys Tyr Pro Glu Glu Cys Glu Arg Glu Leu Leu Leu Glu Leu Phe  
 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 TGC ACC ATT GTG CGC CCT TCC CGG CGG GAT GGC TGG CGC ACC CGC CGA CCT CGG ACC ACC CCC ACT GGC CGC CCT ACC TCC ACC AAC CGA CCT  
 Cys Thr Asn Val Ala Phe Pro Pro Asp Ala Leu Arg Met Arg Ala Pro Ala Ser Pro The Ala Gly Arg Ser Cys His Pro Thr Gly Ser  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530  
 ACC TGG CCT CCC CGC TGG CTG AGA ATC ACC ATT CCT ACC ACA TGG CGC CCT CGC CGC CGC CCT ACC TCC AGG TGC TGG CCT TCC CCT ACC ACT AGG ACC  
 Thr Pro Pro Ala Lys Leu Arg Ile Thr Ile Pro Thr Ser Pro Gly Tyr Glu Pro Glu Pro Ser Ser Lys Leu Ser Cys Pro Pro Thr Lys Arg Ser  
 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 CGC CGG ATG GAA CGA GAT CCT GTC TCC CGG CCT TAC ATG CTC TGG ATT GAG GAC GAC ATA CGA CGG CCT TCC ACC GCA ACT GCA CGG ACT CGG  
 Pro Gly Val Glu Cln Asp Pro Val Cys Pro Gly Ser Pro Pro Tyr Met Leu Trp Asn Glu Asp Ile Gly Pro Cys The Ala Ala Ser Gly  
 1630 1640  
 CCT TGG ATG TGA TGA  
 Val Ser Met Ile

る全長 cDNA (AD1963) の塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図3】本発明のタンパク質をコードするcDNAを保持するプラスミドpTB1963の構築図を示す。AD1963は本発明のタンパク質をコードする全長cDNAを示す。

### 【图2】

【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	A D N
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 48/00	
" 48/00	ADN	49/00	A
" 49/00		C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 H 21/04		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C
15/09	ZNA	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/02		33/577	Y
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/08	
33/577		A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 15/00	ZNA A
(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 N 15/09	ZNA		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			